

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
Klinikum der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Pathogenese und Therapie der pulmonalen Inflammationsreaktion bei experimentellem ARDS

Kumulative Habilitationsschrift



vorgelegt von
Dr. med. Sandra Högl
(2017)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. BEDEUTUNG DER ARBEIT FÜR DAS FACHGEBIET | 3 |
| 2. HINTERGRUND | 4 |
| 2.1. Experimentelle ARDS Modelle | 4 |
| 2.2. Konzept der inhalativen Therapie..... | 4 |
| 2.3. Antiinflammatorische Therapie | 5 |
| 2.4. Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) und Adenosin..... | 6 |
| 3. ERGEBNISSE | 7 |
| 3.1. Etablierung eines tierexperimentellen Modells des beatmungsinduzierten Lungenschadens (VILI)..... | 7 |
| 3.2. Die Inhalation von IL-10 vermindert das Biotrauma beim beatmungsinduzierten Lungenschaden der Ratte | 8 |
| 3.3. Die Inhalation von Interleukin-22 induziert SOCS3 und kann den beatmungsinduzierten Lungenschaden der Ratte vermindern | 9 |
| 3.4. Die Rolle epithelialer A2B Adenosinrezeptoren in einem „Two-Hit“- Mausmodell des akuten Lungenschadens | 12 |
| 3.5. T-bet+ NK Zellen tragen durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Pathogenese des LPS-induzierten, akuten Lungenschadens der Maus bei | 16 |
| 4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 19 |
| 5. LITERATURVERZEICHNIS | 21 |
| 6. DANKSAGUNG | 25 |
| 7. LEBENSLAUF | 26 |
| 8. SCHRIFTENVERZEICHNIS | 28 |
| 9. PUBLIKATIONEN DER KUMULATIVEN HABILITATIONSLEISTUNG..... | 31 |

1. Bedeutung der Arbeit für das Fachgebiet

Das Krankheitsbild des akuten Lungenversagens (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) ist geprägt durch eine sauerstoffrefraktäre Hypoxämie auf dem Boden eines nicht-kardial bedingten Lungenödems mit Schädigung der alveolo-kapillären Barriere [12]. Ein ARDS kann durch direkte oder indirekte Pathomechanismen hervorgerufen werden. Hierzu zählen unter anderem Aspiration, Pneumonie, Lungenkontusion, Sepsis oder Polytraumatisierung mit hämorrhagischem Schock und Massivtransfusion. Postoperativ entwickeln – u.a. abhängig von Art und Umfang der Operation – 0,6% bis 7,5% der Patienten ein ARDS. Damit ist das ARDS eine zwar seltene aber schwere Komplikation mit einer Sterblichkeit von 15% bis zu 91% [24-26].

Trotz zahlreicher experimenteller und klinischer Studien konnte die Letalität des ARDS seit den 90er Jahre nicht weiter gesenkt werden. Eine signifikante Verringerung der Letalität konnte bislang nur durch therapeutische Ansätze erreicht werden, die zusätzliche Schädigungen der Lunge durch die invasive Beatmung (ventilator-induced lung injury, VILI) verhindern [42]. Dies sind vor allem lungenprotektive Beatmungsstrategien mit niedrigen Tidalvolumina, sowie die Bauchlagerung und ggf. Gabe von Muskelrelaxantien. In spezialisierten ARDS-Zentren werden zudem erweiterte Therapiemaßnahmen wie extrakorporale Lungenersatzverfahren zur Sicherung des Gasaustausches eingesetzt.

In der akuten Phase des ARDS kommt es zur Zerstörung von pulmonalen Epithelzellen (v. a. Typ I Alveolarepithelzellen) und die alveolo-kapilläre Membran wird durchlässig für proteinreiche Flüssigkeit, Erythrozyten, Leukozyten und Fibrin. Es entsteht ein interstitielles und alveoläres Ödem, welches Surfactant inaktiviert. Neben der Aktivierung von Alveolarmakrophagen kommt es zum Einstrom neutrophilen Granulozyten, die weitere Freisetzung von Entzündungsmediatoren perpetuiert die lokale Inflamationsreaktion. Ein möglicher Therapieansatz bei ARDS wäre demnach die Applikation immunmodulierender Substanzen bzw. die Blockierung proinflammatorischer Signalwege, um die pulmonale Entzündungsreaktion zu unterbinden.

Ziel der im Rahmen dieser Habilitationsschrift vorgestellten Untersuchungen war es, weitere Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie der pulmonalen Inflamationsreaktion beim ARDS zu gewinnen.

2. Hintergrund

2.1. Experimentelle ARDS Modelle

Insbesondere experimentelle Kleintiermodelle eignen sich für den Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung und zur Erprobung neuer Therapieoptionen. Besonders attraktiv ist hierbei die Möglichkeit des Gen-Targetings von Mäusen, d.h. dass gezielt Gene deaktiviert werden können. Mittlerweile ist es nicht nur möglich, das gewünschte Gen in allen Zellen „auszuknocken“, sondern auch gewebespezifische Knockout-Mäuse zu züchten – der sogenannte konditionale Knockout mittels Cre/loxP Rekombinationssystem. Des Weiteren kann ein Gen auch erst nach Abschluss der Embryonalentwicklung deaktiviert werden, dies gelingt durch Einbringen einer Liganden-aktivierbaren Cre Rekombinase. Dabei wird erst durch Gabe des synthetischen Liganden (z.B. Tamoxifen) ein entsprechender Knockout generiert [9].

Komplexe klinische und pathophysiologische Veränderungen, wie sie auch bei einem ARDS entstehen, sind jedoch oft nur eingeschränkt in tierexperimentellen Modellen – insbesondere Kleintiermodellen – abbildbar. Abhängig von der Fragestellung werden deswegen verschiedene experimentelle ARDS-Modelle verwendet [31].

Eine gängige Methode um eine reproduzierbare, pulmonale Inflamationsreaktion auszulösen, ist die Inhalation oder intratracheale Instillation von bakteriellen Endotoxinen (Lipopolysaccharid, LPS) oder lebenden Bakterien. Ähnlich einer Pneumonie kommt es zum Einstrom von Entzündungszellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, der Zerstörung der alveolo-kapillären Barriere und der Ausbildung eines pulmonalen Ödems [40]. Eine weitere Möglichkeit, ein ARDS experimentell zu induzieren, ist die Beatmung mit hohen inspiratorischen Beatmungsdrücken und -volumina (VILI) [6,16]. Hierbei kommt es primär zur direkten epithelialen Gewebsschädigung (Barotrauma), und im weiteren Verlauf zur Aktivierung der Inflamationskaskade (Biotrauma) sowie lokaler und systemischer Hypoxie.

In vitro lässt sich mechanischer Stress von pulmonalen Epithelzellen durch Kultivierung dieser auf speziellen Kulturschalen mit flexiblem Boden erreichen. Durch Anlegen eines computergesteuerten, definierten Vakuums wird eine Dehnung des Bodens der Kulturschale und somit der angehefteten, kultivierten Zellen erreicht.

2.2. Konzept der inhalativen Therapie

Die pulmonal-topische Applikation von Pharmaka per inhalationem ist ein attraktives Konzept zur Therapie pulmonaler, pulmonal-vaskulärer und bronchialer Erkrankungen. Die direkte Applikation einer Substanz in die Lunge umgeht die Metabolisierung – vor allem in der Leber – mit möglichem Wirkungsverlust oder

Giftung. So können suffizient hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen erreicht werden und gleichzeitig systemische Nebenwirkungen vermieden werden (pulmonale Selektivität). Das intrapulmonale Depositionsverhalten eines Aerosols hängt im Wesentlichen vom Durchmesserpektrum seiner Partikel ab. Partikel mit einem geometrischen Durchmesser zwischen 0,5 bis 2 µm deponieren bevorzugt in alveolären Bereichen [15].

Während bei spontanatmenden Probanden 2-10% einer vernebelten Lösung die Lunge erreichen, liegt der Prozentsatz der intrapulmonalen Deposition bei intubierten, beatmeten Patienten auf Grund der ungünstigeren Voraussetzungen (Beatmungssystem mit Endotrachealtubus, artifizielles Beatmungsmuster, größerer Totraum) bei weniger als 3% [34,41]. Die inhalative Applikation von Substanzen in intubierten und beatmeten Kleintieren ist auf Grund der geringeren Größe der Lungenanatomie noch weit schwieriger, so dass nur wenige Studien dazu vorliegen [11,28]. In den hier präsentierten Studien kamen speziell für den Einsatz in Ratten bzw. Mäusen entwickelte, teilweise durch uns modifizierte und evaluierte Verneblersysteme zum Einsatz [19,22].

2.3. Antiinflammatorische Therapie

Bei ARDS-Patienten können in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und IL-6) [30]) nachgewiesen werden, während die Konzentrationen ihrer physiologischen, anti-inflammatorischen Gegenspieler [wie IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra)] erniedrigt sind [5].

Die inflammatorischen Prozesse beim ARDS beschränken sich jedoch nicht nur auf die Lunge, sondern können auch systemische Entzündungsreaktionen im Sinne einer SIRS (systemic inflammatory response syndrome) hervorrufen [10]. Insbesondere beim persistierenden ARDS sind bei den Patienten sowohl erhöhte pulmonale als auch systemische Zytokin- und Chemokinkonzentrationen nachweisbar, was zu extrapulmonalen Organdysfunktionen führen kann [32]. Demnach wäre die Modulation des bestehenden pulmonalen Ungleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren eine vielversprechende Therapieoption. Obgleich bereits einige immunmodulierende Substanzen im Tierversuch vielversprechende Ergebnisse erzielen konnten (z.B. Simvastatin, Human Monoclonal Anti-Endotoxin Antibody), konnte bislang noch in keiner randomisiert-kontrollierten Studie ein Überlebensvorteil bei ARDS-Patienten erzielt werden [42].

Obwohl initial in der Pathogenese des ARDS zunächst die Alveolarmakrophagen auf inflammatorische Reize reagieren, scheinen auch andere residente und einwandernde Leukozytenfraktionen, wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beteiligt zu sein [4]. Die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten spielt die entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung

des pulmonalen Entzündungsprozesses beim ARDS [14]. Auch korreliert die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL mit dem Schweregrad eines ARDS [38]. Im ARDS-Tiermodell wurde die Depletion bzw. Blockade der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge bereits erfolgreich therapeutisch eingesetzt [1,36].

2.4. Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) und Adenosin

Die Regulation des Sauerstoffangebots und -verbrauchs ist für das Überleben von Zellen, Geweben, Organen und somit des gesamten Organismus entscheidend. Deswegen müssen Zellen möglichst schnell auf einen Sauerstoffmangel (Hypoxie) bzw. erhöhten Sauerstoffbedarf reagieren können. Beim ARDS entsteht eine Hypoxie durch die voranschreitende Inflammationsreaktion bei sich gleichzeitig verschlechterndem Gasaustausch. Die Sauerstoffhomöostase unterliegt der Kontrolle des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 (HIF-1) und seiner Zielgene. Gegenwärtig wird eine entscheidende Rolle von HIF-1 in der Kontrolle der Expression von 2-5% des gesamten Genoms angenommen, aktuell sind bereits etwa 100 HIF Zielgene validiert [29]. HIF-1 spielt bei allen Erkrankungen, bei denen es zu einer lokalen oder globalen Sauerstoffminderversorgung kommt, wie z.B. Ischämie, Infektionen und Tumorwachstum eine wichtige Rolle. Dabei wirken insbesondere die Prolylhydroxylasen (PHD1-3) als O₂-Sensoren, da sie unter Anwesenheit von Sauerstoff den proteasomalen Abbau der HIF-1 α Untereinheit einleiten.

In Abhängigkeit von Zelltyp und Stimulus kann die Regulation von HIF-1 auch unter Normoxie erfolgen, wie z.B. durch Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder über Bakterien, sowie Virenbestandteile [8]. HIF-1 aktiviert Regulatoren der Angiogenese (z.B. Vascular endothelial growth factor, VEGF), der Erythropoese (z.B. Erythropoetin), des Eisenstoffwechsels (z.B. Transferrin) und des Gefäßtonus (z.B. NO-Synthase, Hämoxygenase-1), um eine bessere Versorgung mit Sauerstoff zu ermöglichen. Des Weiteren reguliert HIF-1 die Umstellung des Energiestoffwechsels auf die Glykolyse (z.B. durch erhöhte Expression der Glukosetransporter Glut-1 und -3) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation (z.B. durch Wachstumsfaktoren wie insulin-like growth factor, IGF-2), Apoptose (z.B. durch Caspase-3) und Zellmigration (z.B. durch Matrix-Metalloproteinasen, MMP-2) [45].

Die Aktivierung von HIF-1 führt außerdem zu einem Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration. Dabei entsteht extrazelluläres Adenosin vornehmlich beim Abbau des Energieträgers ATP. Die vielfältigen Effekte von Adenosin auf unterschiedliche Organsysteme werden über vier Rezeptoren vermittelt: Adenosin A1, A2A, A2B und A3 Rezeptor. HIF-1 α induziert nicht nur die enzymatische Kapazität, um extrazelluläres Adenosin zu bilden, sondern Hypoxie induziert auch die Expression von Adenosinrezeptoren und aktiviert somit Adenosinrezeptor-vermittelte Signalwege, insbesondere über A2A und A2B Rezeptoren. Funktionelle

Studien bei experimentellem ARDS konnten zeigen, dass über die Aktivierung von A2B Adenosinrezeptoren eine überschießende Entzündungsreaktion verhindert und gleichzeitig die Resolution einer bereits eingetretenen Lungenschädigung eingeleitet werden kann [7,19,37,40].

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines tierexperimentellen Modells des beatmungsinduzierten Lungenschadens (VILI)

Obwohl oft lebensrettend, kann die kontrollierte, maschinelle Beatmung per se eine Reihe unerwünschter Wirkungen in der Lunge verursachen, die in ihrer Summe als beatmungsinduzierter Lungenschaden (ventilator-induced lung injury, VILI) bekannt sind [43]. Unsere Arbeitsgruppe stellte sich die Frage, inwieweit auch im Tiermodell ein reproduzierbarer VILI etabliert werden kann.

Zur Induktion eines VILI wurden Ratten ($n = 16$) für 20 min mit einem Spitzendruck von 45 cmH₂O und einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 0 druckkontrolliert beatmet. Die Vergleichsgruppe ($n = 8$) wurde mit einem p_{\max} von 20 cmH₂O und einem PEEP von 4 cmH₂O beatmet. Die VILI-Tiere zeigten einen Abfall des paO_2 und des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) mit gleichzeitigem $paCO_2$ -Anstieg, nur 4 von 16 Tieren überlebten den Beobachtungszeitraum von 4 Stunden nach VILI-Induktion. Die Lungen der Tiere zeigten schwere makroskopische und mikroskopische Schädigungen (Abbildung 1).

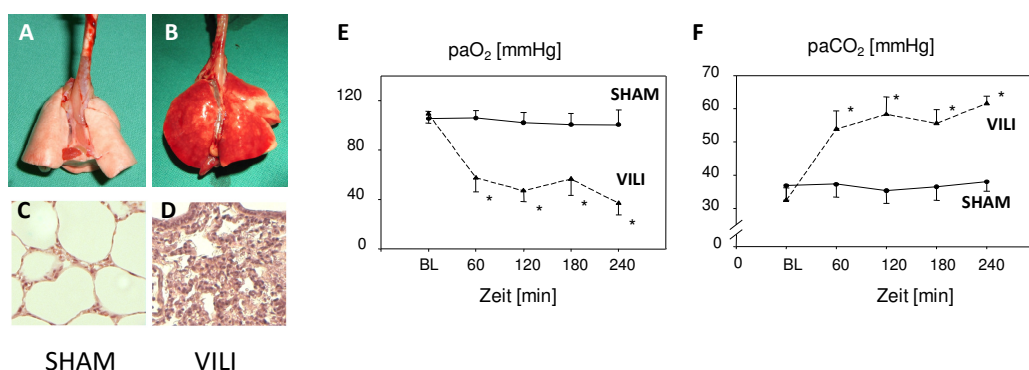


Abbildung 1: Sham: 240 min Beatmung mit p_{\max} 20 cmH₂O, VILI: 20 min Beatmung mit p_{\max} 45 cm H₂O, gefolgt von 240 min p_{\max} 20 cm H₂O. (A+B) Makroskopie. (C+D) Mikroskopie (HE-Färbung) der Lunge. Verlauf von (E) paO_2 und (F) $paCO_2$. Median [semi-IQR], * $p < 0,05$.

Es kam zum pulmonalen Einstrom von Ödemflüssigkeit und neutrophilen Granulozyten, sowie zur Aktivierung von Alveolarmakrophagen. Sowohl in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) als auch im Plasma kam es zum Anstieg der Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Macrophage inflammatory

protein (MIP)-2 und IL-1 β . Die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen und die Expression von Heat Shock Protein 70 in der Lunge wurde durch VILI ebenfalls induziert.

Das untersuchte experimentelle VILI-Modell führte zu einer starken pulmonalen und subsekventen systemischen inflammatorischen Reaktion (Biotrauma) mit ausgeprägten Organdysfunktionen, und scheint demnach für Untersuchungen möglicher Therapieoptionen des ARDS geeignet [16].

3.2. Die Inhalation von IL-10 vermindert das Biotrauma beim beatmungsinduzierten Lungenschaden der Ratte

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass im Endotoxinämie-induzierten Lungenschaden die pulmonale Inflammation durch die prophylaktische Inhalation des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin (IL)-10 vermindert wird [23]. Wir stellten uns die Frage, inwieweit sich dieses Konzept auf den beatmungsinduzierten Lungenschaden übertragen lässt.

Nach Genehmigung durch die Tierversuchskommission erfolgte die Untersuchung an 36 narkotisierten (Fentanyl/Pentobarbital, i.v.), kontrolliert beatmeten Sprague-Dawley-Ratten [17]. Nach Tracheotomie sowie Kanülierung der Leistengefäße wurden die Tiere zufällig folgenden 4 Versuchsgruppen (n = 9) zugeteilt: Sham: Beatmung der Tiere für 240 min (Stephanie®, p_{max}: 20 cmH₂O, PEEP: 4 cmH₂O, f: 30/min, FiO₂: 21%, I:E = 1:2) ohne weitere Intervention; VILI: Induktion eines mechanischen Lungenschadens durch 20 min Beatmung mit p_{max}: 45 cmH₂O, PEEP: 0, I:E = 1:1; IL-10high (10 µg/kgKG) bzw. IL-10low (1 µg/kgKG): vor VILI-Induktion 40 min Jet-Vernebelung von IL-10. Der Beobachtungszeitraum betrug 240 min. BAL, Plasma und Lungenproben wurden nur asserviert, wenn die Tiere 120 min nach VILI-Induktion noch lebten (n2-4h). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rangsummentest mit Bonferroni-Korrektur, p<0,05, Angabe der Ergebnisse als Median [semi-IQR].

Die Inhalation von IL-10 (10 µg/kgKG) konnte die makroskopisch sichtbare Lungenschädigung signifikant vermindern, die 10fach niedrigere Dosierung von IL-10 zeigte geringere protektive Effekte (Lungenscore: Sham: 0, VILI: 11,0 [0,5], IL-10high: 4,0 [0,5], IL-10low: 9,0 [3,0]). Der Proteingehalt in der BAL war in beiden IL-10 Gruppen signifikant vermindert (Sham (n2-4h = 9): 249 [15] µg/ml, VILI (n2-4h = 7): 1469 [215] µg/ml, IL-10high (n2-4h = 8): 859 [308] µg/ml, IL-10low (n2-4h = 4): 929 [250] µg/ml. Auch die pulmonalen Konzentrationen von IL-1 β und MIP-2 sowie die Expression von MMP-9 und HSP-70 wurden durch IL-10-Aerosol reduziert (Abbildung 2).

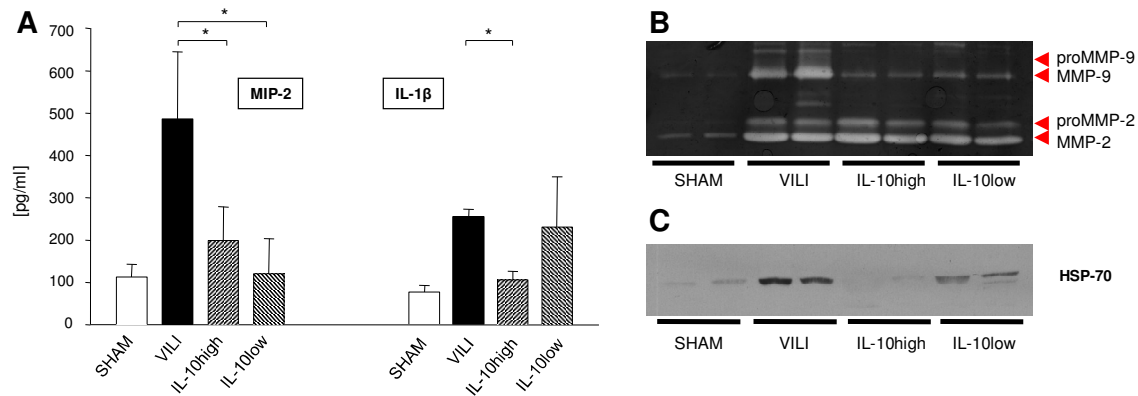


Abbildung 2: VILI-Induktion: 20 min Beatmung mit p_{\max} 45 cmH₂O, 240 min Beobachtungszeitraum (SHAM-Beatmung mit p_{\max} 20 cmH₂O), IL-10high (10 µg/kgKG), IL-10low (1 µg/kgKG). **(A)** Zytokinkonzentrationen (MIP-2, IL-1β) in der BAL, ELISA. **(B)** Zymographie, latente/aktive Formen von MMP, BAL, exemplarisch je 2 Tiere/Gruppe. **(C)** Western Blot gegen HSP-70, Lungenhomogenat, exemplarisch je 2 Tiere/Gruppe. Median [semi-IQR], *p < 0,05 vs. VILI.

Die prophylaktische Inhalation von Interleukin-10 vermindert die pulmonale Entzündungsreaktion und Stressantwort bei beatmungsinduzierter Lungenschädigung der Ratte und verringert sowohl die pulmonale Schrankenstörung als auch den Gewebeschaden [17].

3.3. Die Inhalation von Interleukin-22 induziert SOCS3 und kann den beatmungsinduzierten Lungenschaden der Ratte vermindern

Interleukin (IL)-22 ist ein Mitglied der IL-10-Zytokinfamilie mit primärer Wirkung auf ortsständige, nichtleukozytäre Zellen und scheint eine wichtige Rolle bei der unspezifischen Immunantwort zu spielen [33]. Die immunmodulierende Wirkung von IL-22 ist hierbei u.a. über den STAT3/SOCS3-Signalweg vermittelt. Zum einen besitzt IL-22 bei akuter Hepatitis protektive Eigenschaften, zum anderen wirkt es bei experimenteller Sepsis proinflammatorisch [35,44]. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Effekte einer pulmonalen Applikation von IL-22 bei VILI zu untersuchen.

Nach Genehmigung durch die Tierversuchskommission erfolgte die Untersuchung an 18 narkotisierten (Fentanyl/Pentobarbital, i.v.), kontrolliert beatmeten Sprague-Dawley-Ratten. Nach Tracheotomie sowie Kanülierung der Leistengefäße wurden die Tiere zufällig 2 Versuchsgruppen (je n = 9) zugeteilt (Beobachtungszeitraum 240 min): VILI: Induktion eines mechanischen Lungenschadens durch 20 min Beatmung mit p_{\max} : 45 cmH₂O, PEEP: 0, f: 30/min, FiO₂: 21%, I:E = 1:1; IL-22: vor VILI-Induktion 40 min Jet-Vernebelung von IL-22 (10 µg/kgKG). Vor und nach VILI-Induktion Beatmung der Tiere mittels eines neonatologischen Beatmungsgerätes (Stephanie®, p_{\max} : 20 cmH₂O, PEEP: 4 cmH₂O, I:E = 1:2). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Rangsummentest bzw. Log Rank Test, p<0,05, Angabe der Ergebnisse als Median [semi-IQR] bzw. Box Plots [1./3. Quartil].

Die Inhalation von IL-22 verlängerte die 4h-Überlebensrate (Abbildung 3A) und reduzierte die makroskopisch sichtbare Lungenschädigung (Lungenscore: 11 [3,0] vs. 15 [1,5], $p=0,008$). Gleichzeitig führte IL-22-Aerosol im Lungengewebe zur Phosphorylierung von STAT3 sowie vermehrten Expression von SOCS3 auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 3B und 3C). Die immunhistochemischen Lungenschnitte der IL-22-Gruppe zeigten eine vermehrte Anti-pSTAT3-Antikörper-Bindung an Epithelzellen (Abbildung 3D, Pfeile).

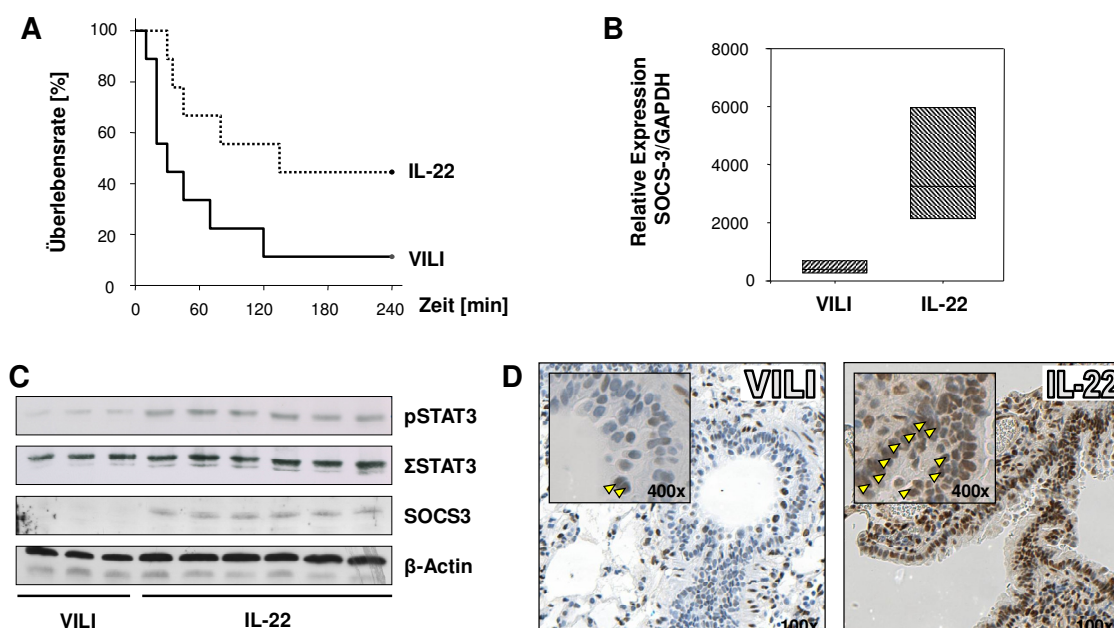


Abbildung 3: VILI-Induktion: 20 min Beatmung mit p_{\max} 45 cmH₂O, 240 min Beobachtungszeitraum (SHAM-Beatmung mit p_{\max} 20 cmH₂O), IL-22 Aerosol (10 μ g/kgKG). **(A)** Kaplan-Meier-Überlebenskurve, Log Rank Test, $p=0,047$. **(B)** Densitometrische Auswertung des mRNA-Expressionverhältnisses SOCS3 / GAPDH, $p = 0,024$, n_{1-4h} . **(C)** Western Blots, Lungenhomogenat, n_{1-4h} . **(D)** Immunhistochemie gegen pSTAT3, Lunge

In weiterführenden ex vivo Untersuchungen in Lungengewebe und in vitro Untersuchungen an der humanen Lungenepithelzelllinie A549 wurde die Kausalität und Kinetik der IL-22 abhängigen STAT3/SOCS3-Induktion untersucht.

Die immunhistochemisch markierten Lungenschnitte von ex vivo mit IL-22 inkubiertem Lungengewebe zeigten eine vermehrte Aktivierung von STAT3 in Epithelzellen (Abbildung 4A, braun angefärbt). Auch in Immunoblot-Analysen von Lungenhomogenat war diese Aktivierung von STAT3 nachweisbar (Abb. 4B). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression von SOCS3 als ein typisches STAT3-Zielgen hochreguliert wurde (Abbildung 4B).

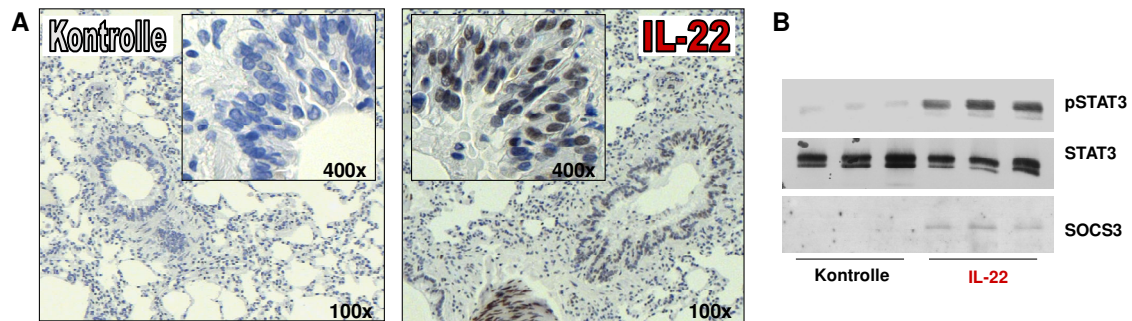


Abbildung 4: Ex Vivo Stimulation von Lungengewebe mit IL-22 (20 ng/ml).
(A) Immunhistochemie gegen pSTAT3. **(B)** Westernblot, Lungenhomogenat

In A549 Zellen zeigte sich unter dem Einfluss von IL-22 ein rascher und (im Vergleich zu IL-6 (Abbildung 5B) ausgeprägter Anstieg der STAT3 Phosphorylierung (Abbildung 5A), während STAT1 durch IL-22 nicht aktiviert wurde (Abbildung 5B). Ebenso kam es zu einer frühen Induktion von SOCS3 auf mRNA und Proteinebene (Abbildung 5A+5C). Eine Verringerung der Genexpression und Aktivität von STAT3 nach IL-22 Stimulation mittels Transfektion von small interfering RNA (siRNA) konnte die SOCS3-Induktion durch IL-22 effektiv verhindern (Abbildung 5D).

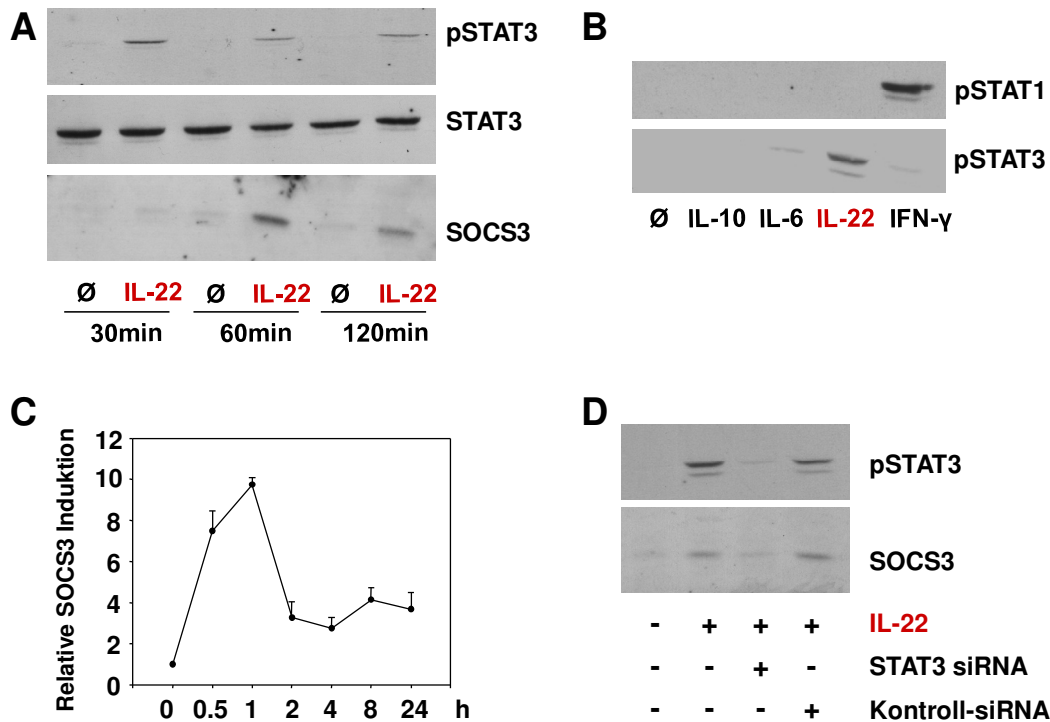


Abbildung 5: Induktion von STAT3/SOCS3 in A549 Lungenepithelzellen durch IL-22 **(A)** Immunoblots, Zeitkinetik nach IL-22 Stimulation (20 ng/ml). **(B)** Immunoblots, 1 h Zytokinstimulation (jeweils 20 ng/ml). **(C)** Real Time PCR, Zeitkinetik der SOCS3-Induktion nach IL-22 Stimulation (20 ng/ml), (n = 4; relative SOCS3 Induktion, normalisiert auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle). **(D)** Immunoblots, 72 h Transfektion mit siRNA, 60 min Inkubation mit IL-22 (20 ng/ml).

Die prophylaktische Inhalation von IL-22 schützt vor dem beatmungsinduzierten Lungenschaden der Ratte und verlängert das Überleben. IL-22 scheint STAT3-vermittelt effizient und langanhaltend SOCS3 in Lungenepithelzellen zu induzieren. Die antiinflammatorische und protektive Wirkung von IL-22 bei VILI ist demnach möglicherweise über eine STAT3-Phosphorylierung und konsekutive Hochregulation des negativen Feedbackregulators SOCS3 vermittelt [18].

3.4. Die Rolle epithelialer A2B Adenosinrezeptoren in einem „Two-Hit“-Mausmodell des akuten Lungenschadens

Die Aktivierung endogener Signalwege ist ein pulmonaler Schutzmechanismus bei ARDS, um die Lunge vor einer überschießenden, inflammatorischen Reaktion zu schützen. Hierbei scheint extrazelluläres Adenosin über Bindung an spezifische Adenosinrezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen [7,37]. In einem kombinierten Modell des LPS- und beatmungsinduzierten Lungenschadens (ALI) untersuchten wir die Hypothese, dass insbesondere die Aktivierung von A2B Adenosinrezeptoren lungenprotektiv wirkt.

Alle Tierversuche wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt. Zunächst erhielten die Mäuse LPS intratracheal (3,75 mg/kgKG), nach 24h erfolgte nach Tracheotomie die 180-minütige druckkontrollierte Beatmung zur Induktion eines Lungenschadens (p_{\max} : 35 cmH₂O, PEEP: 3 cmH₂O, AF: 95/min, FiO₂: 100%). Die Shamgruppe erhielt PBS intratracheal und wurde mit einem Spitzendruck von 15 cmH₂O beatmet (AF: 110/min). Folgende Mauslinien wurden verwendet (n = 5-6): Ganzkörper-Knockout des A2B Rezeptors (Adora2b^{-/-}), gewebespezifische A2B Rezeptor defiziente Mäuse mit Deletion von Adora2b in der myeloischen Zellreihe (Adora2b^{fl}/Lysozyme^{Cre}), in Endothelzellen (Adora2b^{fl}/fCadherin^{Cre}), bzw. Epithelzellen (Adora2b^{fl}/fSurfactant^{Cre}). Mäuse mit dem passenden genetischen Hintergrund dienten als Kontrolle. Um die therapeutische Aktivierung von pulmonalen Adora2b Rezeptoren zu untersuchen, applizierten wir C57/BL6 Mäusen während der VILI-Induktion einen spezifischen A2B Rezeptor Agonisten (BAY 60-6583, 1 mg/kgKG) mittels Ultraschallverneblers. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und Post-Hoc-Tests mit Bonferroni Korrektur, * $p < 0,05$, Ergebnisse als Mittelwert [SD].

Adora2b^{-/-} Mäuse zeigten nach ALI im Vergleich zu C57/BL6 Mäusen ausgeprägtere pulmonale Schäden und eine erhöhte Durchlässigkeit der alveolo-kapillären Barriere (Albuminkonzentration (BAL): 1891 [549] vs. 818 [121] µg/ml. Im direkten Vergleich des gewebespezifischen Knockouts zeigte nur die epitheliale Adora2b Deletion einen entsprechenden Phänotyp mit Verstärkung des Lungenschadens. Die Myeloperoxidase-Konzentration (MPO), als Surrogatparameter für die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL, war in den Adora2b^{fl}/fSurfactant^{Cre} Mäusen signifikant erhöht, ebenso die pulmonale mRNA-Expression inflammatorischer Zytokine. Des Weiteren war der Flüssigkeitstransport über die Zellmembran gestört (Abbildung 6).

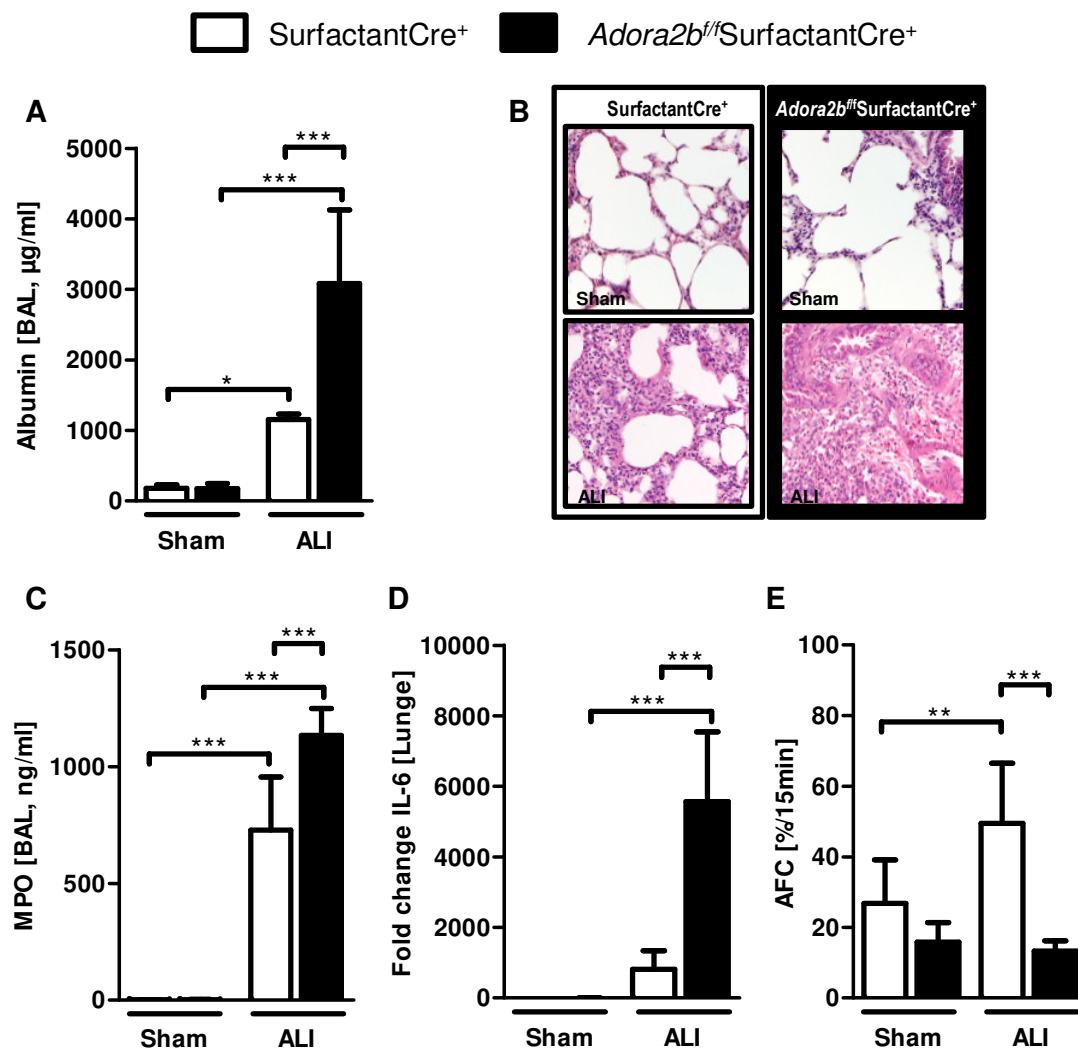


Abbildung 6: Epitheliale *Adora2b* Deletion aggraviert ALI (LPS i.t., 24 h später Beatmung mit p_{\max} 35 cmH₂O für 180 min). **(A)** Albuminkonzentration (ELISA, BAL). **(B)** Repräsentative histologische Lungen-schnitte, 10x. **(C)** MPO-Konzentration (ELISA, BAL). **(D)** RT-PCR gegen IL-6 (Lungengewebe). **(E)** Alveoläre Flüssigkeitsclearance (in % des instillierten Volumens). Mean + SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Demgegenüber verbessert die Inhalation des spezifischen A2B Rezeptor Agonisten BAY 60-6583 die alveoläre Flüssigkeitsclearance, auch das pulmonale Ödem und der beatmungsinduzierte Lungenschaden sowie die pulmonale Inflammation sind vermindert (Abbildung 7).

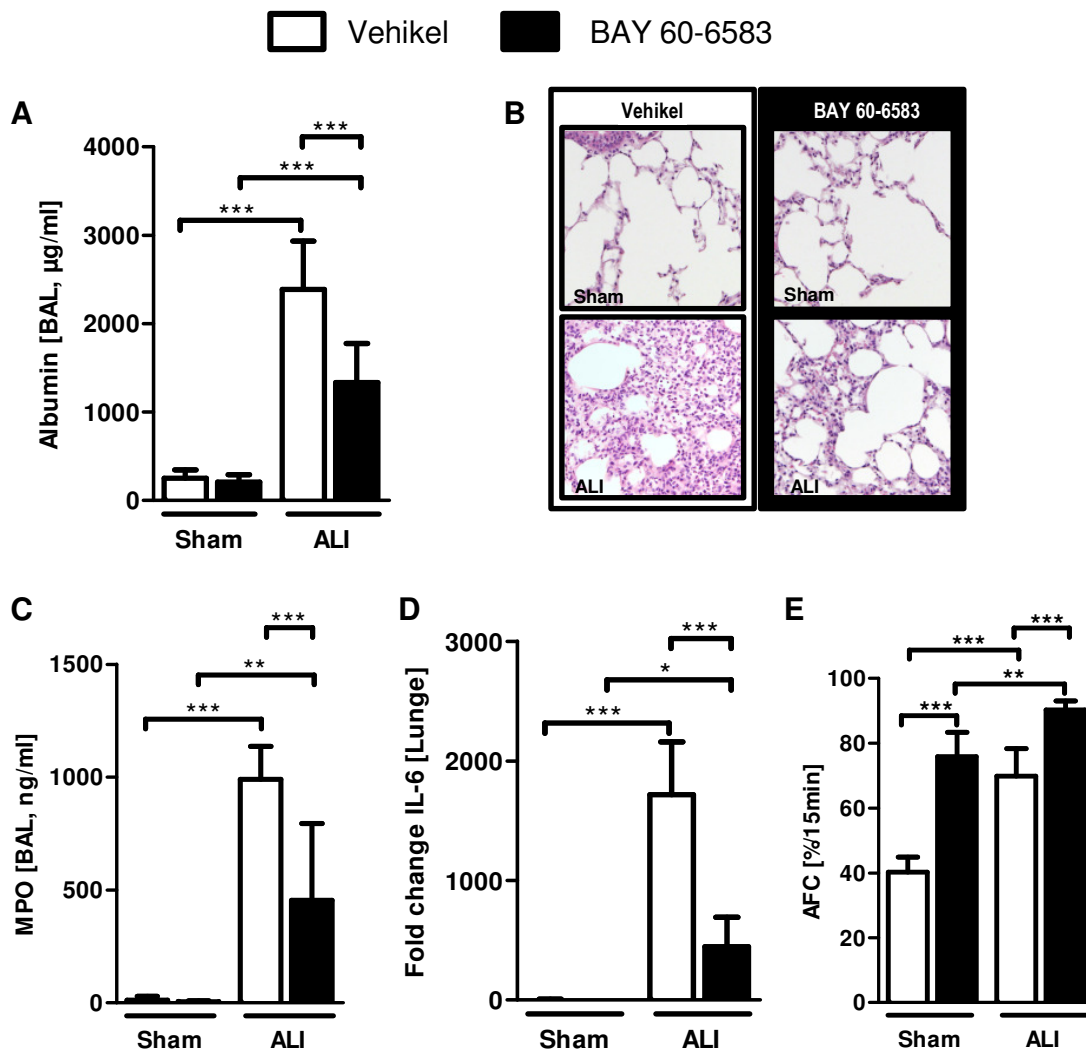


Abbildung 7: Inhalative Applikation des A2B Rezeptor Agonisten BAY 60-6583 schützt vor ALI. **(A)** Albuminkonzentration (ELISA, BAL). **(B)** Repräsentative histologische Lungenschnitte, 10x. **(C)** MPO-Konzentration (ELISA, BAL). **(D)** RT-PCR gegen IL-6 (Lungengewebe). **(E)** Alveoläre Flüssigkeitsclearance (in % des instillierten Volumens). Mean + SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Zusammenfassend weist die Studie auf die lungenprotektive Bedeutung des alveolarepithelialen Adora2B Signalwegs hin, u.a. durch Erhöhung der alveolären Flüssigkeitsclearance. Die Inhalation von A2B Rezeptor Agonisten könnte eine geeignete Therapieoption beim akuten Lungenschaden sein [19].

3.5. T-bet⁺ NK Zellen tragen durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zur Pathogenese des LPS-induzierten, akuten Lungenschadens der Maus bei

Der Einstrom myeloider Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten in die Lunge trägt entscheidend zur initialen Entstehung eines akuten Lungenversagens (ARDS) bei. Welche Mechanismen an der Kontrolle der pulmonalen Entzündungsreaktion und zellspezifischen Zytokinantwort beteiligt sind, ist demnach von hoher therapeutischer Relevanz. Bei chronischen Entzündungsreaktionen, wie dem allergischen Asthma scheint der Transkriptionsfaktor T-bet, der an der Ausreifung von T-Zellen, aber auch von natürlichen Killer (NK) Zellen beteiligt ist, eine wichtige Rolle zu spielen [27,39]. Seine pathophysiologische Rolle beim ARDS ist hingegen unbekannt und wurde daher am LPS induzierten Lungenschaden der Maus untersucht.

Alle Tierversuche wurden durch die zuständigen Behörden genehmigt. Die Mäuse erhielten LPS (5 mg/kgKG) intratracheal, nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert. Folgende Mauslinien wurden verwendet (n = 5-8): WT (C57/BL6), T-bet^{-/-} und CD45.1. Für die Experimente zum adoptiven Zelltransfer extrahierten wir NK Zellen aus der Milz von CD45.1 WT Mäusen mittels „magnetic beads“. Eine Stunde vor LPS Gabe erfolgte die Injektion von $1,5 \times 10^6$ CD49b (DX5)+ NK Zellen (oder Vehikel) in WT oder T-bet^{-/-} Mäuse. Zur statistischen Auswertung verwendeten wir die zweifaktorielle Varianzanalyse (Bonferroni Post-Hoc-Test) bzw. t-Tests, * p<0,05, Ergebnisse als Mittelwert [29].

Die intratracheale LPS-Applikation führte zu einer Induktion von T-bet im Lungengewebe (Abbildung 8A). Der genetische T-bet Knockout scheint in unserem ARDS-Modell protektiv, T-bet^{-/-} Mäuse waren weniger kompromittiert und verloren weniger Körpergewicht im Vergleich zu WT Mäusen (Abbildung 8B). T-bet^{-/-} Mäuse zeigten eine geringere histologische Lungenschädigung und Schädigung der alveolo-kapillären Barriere (Albuminkonzentration (BAL): 404 [73] vs. 196 [17] µg/ml), eine geringere Konzentration proinflammatorischer Zytokine sowie einen verminderten Einstrom neutrophiler Granulozyten. Vergleicht man die relative Expression von T-bet in leukozytären Zellen im Lungengewebe am Tag 3 nach LPS-Gabe, so zeigten sich NK Zellen als primäre Quelle (Abbildung 8C).

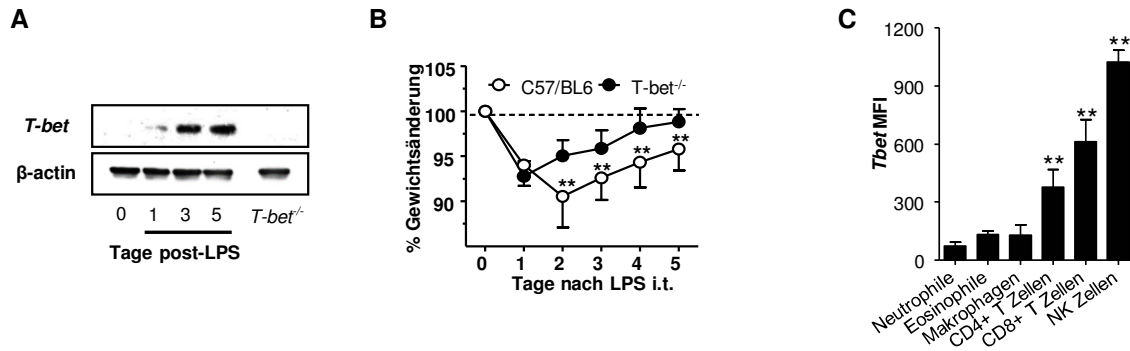


Abbildung 8: LPS i.t. induziert T-bet in NK Zellen. T-bet Knockout wirkt im LPS induzierten Lungenschaden protektiv **(A)** Western blot Lungenhomogenat. **(B)** Körpergewicht der Mäuse nach LPS i.t.. Mean \pm SEM. ** $p < 0,01$ vs. WT. **(C)** Durchflusszytometrie von T-bet: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) in Leukozyten (BAL, Tag 3 nach LPS i.t.). Mean + SEM. ** $p < 0,01$ vs. Isotypenkontrolle

Um nachzuweisen, dass T-bet⁺ NK Zellen neutrophile Granulozyten in die Lunge rekrutieren, die entscheidend an der Pathogenese des ALI beteiligt sind, injizierten wir in unserem LPS-Modell CD45.1 WT NK Zellen in T-bet^{-/-} Mäuse. Diese Tiere verhielten sich in ihrem Schädigungsmuster ähnlich zu WT Mäusen (Abbildung 9A, B). Die Expression des Neutrophilen-Chemotaxins CXCL1 war ebenfalls nur bei den T-bet defizienten Mäusen ohne adoptiven NK Zell-Transfer reduziert (Abbildung 9C). Schließlich führte der NK Zell-Transfer in T-bet^{-/-} zu einem mit WT Mäusen vergleichbaren Einstrom von Neutrophilen in die BAL, während in die Lunge naiver T-bet^{-/-} Mäuse deutlich weniger Neutrophile einwanderten (Abbildung 9D).

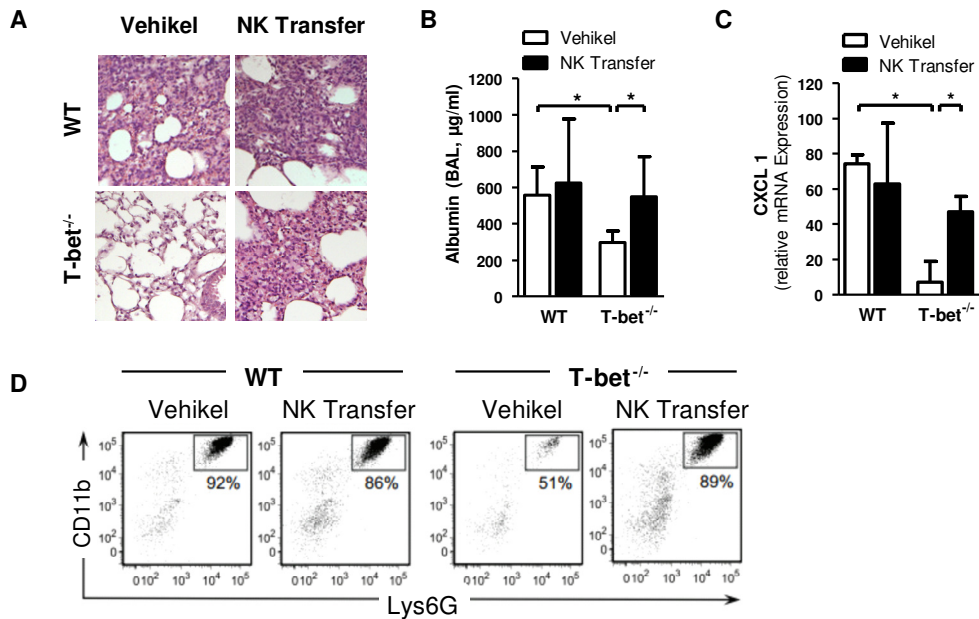


Abbildung 9: Adoptiver NK Zell Transfer. **(A)** Lungenhistologie (H&E, 10x). **(B)** Albuminkonzentration (ELISA, BAL). **(C)** RT-PCR gegen CXCL1 (Lungenhomogenat). **(D)** Durchflusszytometrisches Neutrophilen-Punktwolken-diagramm (BAL, Tag 1 nach LPS i.t.). MW + SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass Tbet⁺ NK Zellen eine wichtige Rolle in der Akutphase eines ARDS spielen, indem sie an der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge beteiligt sind. Eine NK Zell Depletion könnte demnach in der frühen Phase einer nicht-infektiösen Lungenschädigung eine protektive Wirkung auf die Entwicklung eines ARDS haben [21].

4. Zusammenfassung und Ausblick

In den vorgestellten experimentellen Studien wurde ein experimentelles ARDS in unterschiedlichen Kleintiermodellen in der Ratte und der Maus induziert. Zum einen durch Beatmung mit hohen Beatmungsdrücken (Barotrauma), zum anderen durch die intratracheale Applikation von LPS (Biotrauma) [16-18,21]. Auch eine Kombination aus beidem, im Sinne eines „Two-Hit Modells“ führte zu einem mit dem humanen klinischen Bild eines ARDS vergleichbaren Schädigungsmuster [19]. Alle vorgestellten Tiermodelle zeigten pathologische pulmonale bzw. systemische Veränderungen wie Hypoxämie, Lungenödem, Gewebeschädigung, Einstrom von Entzündungszellen und einen Anstieg proinflammatorischer Zytokine. Bei der Planung einer tierexperimentellen Studie sollte das für die jeweilige Fragestellung bzw. den jeweiligen therapeutischen Ansatz am besten geeignete Tiermodell gewählt werden.

Durch die Applikation antiinflammatorisch wirksamer Substanzen per inhalationem kann die lokale und systemische Entzündungsreaktion beim experimentellen ARDS signifikant verringert werden. Dabei können endogene, protektiv wirksame Signalwege als Teil der unspezifischen Immunantwort lokal aktiviert werden. Ein wichtiger und gut charakterisierter immunmodulierender Signalweg ist der JAK/STAT3/SOCS3-Signalweg. SOCS3 wirkt als antiinflammatorischer Modulator, der z.B. über seine antiapoptotischen Eigenschaften und Hemmung der Zytokinexpression die Lunge vor Schädigung schützen kann. Sowohl IL-10 als auch IL-22 können den JAK/STAT3/SOCS3-Signalweg aktivieren, während IL-10 dabei primär auf leukozytäre Zellen (z.B. Alveolarmakrophagen, NK Zellen) antiinflammatorisch wirkt, sind IL-22 Rezeptoren primär auf ortsständigen, nichtleukozytäre Zellen (z.B. Alveolarepithelzellen) exprimiert [17,18]. Die inhalative Therapie mit pulmonalen Vasodilatoren (z.B. Prostaglandine) wird bereits erfolgreich zur Therapie des ARDS eingesetzt [13,20]. Eine Inhalationstherapie mit antiinflammatorischen Substanzen könnte durch Modulation pulmonaler Signaltransduktionswege die Lunge vor Schäden schützen und möglicherweise die Entwicklung eines ARDS verhindern.

Ein weiterer wichtiger endogener Schutzmechanismus ist die Freisetzung von extrazellulärem Adenosin und die Aktivierung von A2B Rezeptoren. Hierbei scheint vor allem der alveolar-epitheliale A2B Rezeptor die pulmonale Inflamationsreaktion beim experimentellen ARDS zu triggern. Der epitheliale Knockout des A2B Rezeptors führt zu einem Anstieg der pulmonalen proinflammatorischen Zytokinkonzentrationen und zur vermehrten Ödembildung. Die Inhalation eines spezifischen A2B Agonisten schützt die Lunge vor Inflammation und Schädigung, und führt zur erhöhten Lungenödem-Clearance [19]. Da die extrazelluläre Adenosinfreisetzung über den HIF-Signalweg reguliert wird, wäre ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt, über eine HIF-Stabilisierung die lungenprotektive Wirkung des Adenosinsignalwegs zu aktivieren. Der Abbau der

HIF-1 α Untereinheit wird durch verschiedene Isoformen von Prolyl-4-Hydroxylasen katalysiert (PHD1-3) [3], die Inhibition dieser PHDs führt somit zur HIF Stabilisierung. Zur Therapie der renalen Anämie wurden bereits im Rahmen klinischer Studien erfolgreich oral verfügbare PHD Inhibitoren eingesetzt, um die Erythropoetin Produktion zu steigern [2]. Die Inhalation eines PHD Inhibitors wäre demnach geeignet HIF-1 im Lungenepithel zu stabilisieren und könnte folglich lungenprotektiv wirken [20].

Neben der Aktivierung von Alveolarepithelzellen spielt auch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des ARDS. Für die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten sind die ortsständigen Zellen der unspezifischen, pulmonalen Immunabwehr entscheidend; dies sind vorrangig Alveolarmakrophagen, aber auch NK Zellen. Der Transkriptionsfaktor T-bet moduliert die Aktivität und Ausreifung von NK Zellen, und wir konnten zeigen, dass der Knockout von T-bet Mäuse vor experimentellem ARDS schützt [21]. Diese protektive Wirkung scheint über eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge vermittelt zu sein. Eine Depletion von NK Zellen schützt ebenso vor akuter Lungenschädigung im Modell des LPS-induzierten ARDS. Ein besseres Verständnis der zellulären, chemotaktischen Regulationsmechanismen könnte neue Therapieansätze bei ARDS hervorbringen.

5. Literaturverzeichnis

1. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, Phillips RJ, Strieter RM: Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest* 2002, 110:1703-1716.
2. Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, Chou J, Schmieder RE, Gunzler V, Eckardt KU: Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21:2151-2156.
3. Bruick RK, McKnight SL: A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001, 294:1337-1340.
4. Costantini C, Micheletti A, Calzetti F, Perbellini O, Pizzolo G, Cassatella MA: Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells. *Int Immunol* 2010, 22:827-838.
5. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, Mackenzie A, Haslett C: The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996, 125:191-196.
6. Eckle T, Fullbier L, Grenz A, Eltzschig HK: Usefulness of pressure-controlled ventilation at high inspiratory pressures to induce acute lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008, 295:L718-724.
7. Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzschig HK: A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* 2008, 118:3301-3315.
8. Eltzschig HK, Carmeliet P: Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011, 364:656-665.
9. Feil R, Brocard J, Mascres B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P: Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:10887-10890.
10. Ferring M, Vincent JL: Is outcome from ARDS related to the severity of respiratory failure? *Eur Respir J* 1997, 10:1297-1300.
11. Flavin M, MacDonald M, Dolovich M, Coates G, O'Brodovich H: Aerosol delivery to the rabbit lung with an infant ventilator. *Pediatr Pulmonol* 1986, 2:35-39.
12. Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS: Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* 2012, 307:2526-2533.
13. Fuller BM, Mohr NM, Skrupky L, Fowler S, Kollef MH, Carpenter CR: The use of inhaled prostaglandins in patients with ARDS: a systematic review and meta-analysis. *Chest* 2015, 147:1510-1522.

14. Grommes J, Soehnlein O: Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med* 2011, 17:293-307.
15. Heyder J: Mechanisms of aerosol particle deposition. *Chest* 1981, 80:820-823.
16. Hoegl S, Boost KA, Flondor M, Scheiermann P, Muhl H, Pfeilschifter J, Zwissler B, Hofstetter C: Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat. *International journal of molecular medicine* 2008, 21:513-519.
17. Hoegl S, Boost KA, Czerwonka H, Dolfen A, Scheiermann P, Muhl H, Zwissler B, Hofstetter C: Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respiratory medicine* 2009, 103:463-470.
18. Hoegl S, Bachmann M, Scheiermann P, Goren I, Hofstetter C, Pfeilschifter J, Zwissler B, Muhl H: Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011, 44:369-376.
19. Hoegl S, Brodsky KS, Blackburn MR, Karmouty-Quintana H, Zwissler B, Eltzschig HK: Alveolar Epithelial A2B Adenosine Receptors in Pulmonary Protection during Acute Lung Injury. *J Immunol* 2015, 195:1815-1824.
20. Hoegl S, Zwissler B, Eltzschig HK, Vohwinkel C: Acute respiratory distress syndrome following cardiovascular surgery: current concepts and novel therapeutic approaches. *Curr Opin Anaesthesiol* 2016, 29:94-100.
21. Hoegl S, Ehrentraut H, Brodsky KS, Victorino F, Golden-Mason L, Eltzschig HK, McNamee EN: NK cells regulate CXCR2+ neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Leukoc Biol* 2017, 101:471-480.
22. Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S, Thein E, Kemming G, Kisch-Wedel H, Kreyling W, Zwissler B: Aerosol delivery during mechanical ventilation to the rat. *Experimental lung research* 2004, 30:635-651.
23. Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S, Muhl H, Zwissler B: Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat. *Critical care medicine* 2005, 33:2317-2322.
24. Kogan A, Preisman S, Levin S, Raanani E, Sternik L: Adult respiratory distress syndrome following cardiac surgery. *J Card Surg* 2014, 29:41-46.
25. Kor DJ, Warner DO, Alsara A, Fernandez-Perez ER, Malinchoc M, Kashyap R, Li G, Gajic O: Derivation and diagnostic accuracy of the surgical lung injury prediction model. *Anesthesiology* 2011, 115:117-128.
26. Kor DJ, Lingineni RK, Gajic O, Park PK, Blum JM, Hou PC, Hoth JJ, Anderson HL, 3rd, Bajwa EK, Bartz RR, et al.: Predicting risk of postoperative lung injury in high-risk surgical patients: a multicenter cohort study. *Anesthesiology* 2014, 120:1168-1181.

27. Lazarevic V, Glimcher LH: T-bet in disease. *Nat Immunol* 2011, 12:597-606.
28. Lizio R, Marx D, Nolte T, Lehr CM, Sarlikiotis AW, Borchard G, Jahn W, Klenner T: Development of a new aerosol delivery system for systemic pulmonary delivery in anaesthetized and orotracheal intubated rats. *Lab Anim* 2001, 35:261-270.
29. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL: Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005, 105:659-669.
30. Martin TR: Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. *Chest* 1999, 116:2S-8S.
31. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, Kuebler WM, Acute Lung Injury in Animals Study G: An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, 44:725-738.
32. Meduri GU, Annane D, Chrousos GP, Marik PE, Sinclair SE: Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy. *Chest* 2009, 136:1631-1643.
33. Nagalakshmi ML, Rascle A, Zurawski S, Menon S, de Waal Malefyt R: Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 2004, 4:679-691.
34. O'Callaghan C, Barry PW: The science of nebulised drug delivery. *Thorax* 1997, 52 Suppl 2:S31-44.
35. Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B: Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 2004, 39:1332-1342.
36. Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, Ley K: Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest* 2006, 116:695-702.
37. Schingnitz U, Hartmann K, Macmanus CF, Eckle T, Zug S, Colgan SP, Eltzschig HK: Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol* 2010, 184:5271-5279.
38. Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD: Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150:113-122.
39. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000, 100:655-669.
40. Thiel M, Chouker A, Ohta A, Jackson E, Caldwell C, Smith P, Lukashev D, Bittmann I, Sitkovsky MV: Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting

mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *PLoS Biol* 2005, 3:e174.

41. Thomas SH, O'Doherty MJ, Fidler HM, Page CJ, Treacher DF, Nunan TO: Pulmonary deposition of a nebulised aerosol during mechanical ventilation. *Thorax* 1993, 48:154-159.

42. Tonelli AR, Zein J, Adams J, Ioannidis JP: Effects of interventions on survival in acute respiratory distress syndrome: an umbrella review of 159 published randomized trials and 29 meta-analyses. *Intensive Care Med* 2014, 40:769-787.

43. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000, 342:1301-1308.

44. Weber GF, Schlautkotter S, Kaiser-Moore S, Altmayr F, Holzmann B, Weighardt H: Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis. *Infect Immun* 2007, 75:1690-1697.

45. Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002, 16:1151-1162.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Bernhard Zwißler, der mich seit Beginn meiner Dissertation auf dem Weg meiner wissenschaftlichen Laufbahn fortwährend unterstützt hat. Auch meine klinische Ausbildung wurde maßgeblich durch sein großes Engagement gefördert und durch seinen kollegialen Führungsstil geprägt.

Als Betreuer meiner Dissertation und ehemaligen Kollegen danke ich Herrn Professor Dr. med. Christian Hofstetter herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Forschungszeit. Er ist zugleich Vorbild, Mentor und Freund und dies hoffentlich auch noch auf meinem weiteren Lebens- und Berufsweg.

Besonderer Dank gilt auch der Nationalen Akademie der Wissenschaften Leopoldina, die mir durch ein Forschungsstipendium ermöglicht hat, einen wichtigen Teil meiner Forschungsarbeiten im Labor von Herrn Professor Dr. med. Holger Eltzschig in Denver, Colorado, USA durchzuführen.

Herrn Professor Dr. med. Holger Eltzschig danke ich für die inspirierende und produktive Zeit am Anschutz Campus, er hat meine Leidenschaft für die Tätigkeit als „Physician-Scientist“ noch weiter bestärkt. Auch den dort tätigen Wissenschaftlern und Mitarbeitern möchte ich herzlich danken. Ich habe mich sehr wohlfühlt und wurde jederzeit kompetent unterstützt.

Des Weiteren danke ich allen Kollegen – vor allem jenen, mit denen ich wissenschaftlich zusammengearbeitet habe – für konstruktive Anregungen, interessante Diskussionen und ihre tatkräftige Unterstützung.

Auch bei meinen Freunden und meiner Familie möchte ich mich bedanken, sie hatten jederzeit ein offenes, geduldiges Ohr bei wichtigen Entscheidungen und in schwierigen Phasen.

Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank meinen Eltern. Sie haben mich auf meinem privaten und beruflichen Lebensweg jederzeit unterstützt, und waren immer für mich da. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

7. Lebenslauf

Dr. med. Sandra Kristina Högl

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 28.02.1979
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
E-Mail: sandra.hoegl@med.uni-muenchen.de

Privatadresse:

Adlzreiterstrasse 8
D-80337 München
Tel.: +49-(0)89-45215956
Mobil: +49-(0)179-4966969

Beruflicher Werdegang

Ab 10/2017 Vertreterin der wissenschaftlichen Mitarbeiter im Fakultätsrat
07/2016 Anerkennung der Zusatzbezeichnung Intensivmedizin
09/2016 – 05/2017 Erweitertes Vorstandsmitglied des Personalrates am KUM
10/2012 – 09/2014 Postdoctoral Research Fellowship, Department of Anesthesiology, University of Colorado, CO, USA
Seit 09/2012 Fachärztin an der Klinik für Anaesthesiologie am Klinikum der Universität München
08/2012 Anerkennung als Fachärztin für Anästhesiologie
08/2011 – 05/2017 Personalratsmitglied am Klinikum der Universität München
04/2009 Fachkunde Rettungsdienst
Seit 11/2008 Prüfarzt für klinische Studien
09/2007 – 08/2012 Weiterbildungsassistentin an der Klinik für Anaesthesiologie am Klinikum der Universität München (KUM)
07/2005 – 08/2007 Weiterbildungsassistentin an der Klinik für Anästhesiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Ausbildung, Studium

10/2005 Promotion (Dissertation aus dem Institut für Chirurgische Forschung, LMU München, Arbeitsgruppe Anästhesiologie: "Die Wirkungen von inhaliertem Interleukin-10 während experimenteller Endotoxinämie in der Ratte." vergeben durch Herrn Prof. Dr. B. Zwißler, Note: Magna cum laude)
05/2005 Approbation
10/1998 – 03/2005 Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
06/1998 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1.4)

Lehrerfahrung

Seit 2008 Dozentin im Rahmen der klinischen Ausbildung in Anaesthesiologie und Intensivmedizin an der Medizinischen Fakultät der LMU München: Seminare, Praktika, Bedside Teaching, OSCE-Prüfungen

| | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| | Tutor für Jung-Assistenten an der Klinik für Anaesthesiologie der LMU München |
| 2002 - 2004 | Erstsemestertutor für Medizinstudenten an der LMU München |
| 2001 - 2002 | Anatomiepräparationsassistentin an der Anatomischen Anstalt der LMU München |

Förderung und Preise

Nominierung für das Aluminitreffen des InterAcademy Medical Panel (IAMP) Young Physician Leader (YPL) im Rahmen der World Health Assembly in Genf; 2016

Nominierung für das IAMP YPL Programm (gefördert durch die Nationale Akademie der Wissenschaften – Leopoldina) und aktive Teilnahme am World Health Summit in Berlin; 2015

1. Preis bei der Posterprämierung für experimentelle Studien Hauptstadtkongress der DGAI (HAI), „Verlust der HIF-Prolylhydroxylase 1 (PHD1) schützt das Lungenepithel vor experimentellem, beatmungsinduzierten Lungenschaden“; 2013

Postdoctoral Research Fellowship, Department of Anesthesiology, University of Colorado, Anschutz Medical Campus, CO, USA, (Prof. H. K. Eltzschig, MD, PhD, CHaIR, Mucosal Inflammation Program) gefördert durch die Nationale Akademie der Wissenschaften – Leopoldina; 2012

Forschungsförderung durch das Wissenschaftliche Herausgeberkolloquium der Münchener Medizinischen Wochenschrift e.V.; 9.500 €; 2010

Mentee im WAKWiN-Mentorenprogramm der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI); 2009

Friedrich-Baur-Stiftung: “Mechanotransduktion und Biotrauma beim beatmungsinduzierten Lungenschaden (VILI): Eine in-vitro Untersuchung (Flexcell®-Stretchkammer) zur Immunmodulation durch Interleukin-22”; 9.000 €; 2008

Posterpreis “37. Bayerische Anästhesietage” 2007, “Die prophylaktische Inhalation von Iloprost vermindert das Biotrauma und die Letalität des beatmungsinduzierten Lungenschadens (VILI) der Ratte”

Forschungsstipendium im Rahmen des Patenschaftsmodells (“Tandemstelle”) in Kooperation mit der Allgemeinen Pharmakologie und Toxikologie (Pharmazentrum Frankfurt) der Universität Frankfurt (Direktor: Prof. Dr. J. Pfeilschifter, AG PD Dr. H. Mühl). “Die Biologie von Interleukin-22: Untersuchungen an humanen Lungenkarzinomzellen und bei mechanischer Lungenschädigung in der Ratte.”, Medizinische Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1 Jahr gefördertes Fellowship und 24.000 € für Materialkosten; 2006

8. Schriftenverzeichnis

1.1. Originalarbeiten als Erstautorin

| | Impact Faktor |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Hoegl S , Ehrentraut H, Brodsky KS, Victorino F, Golden-Mason L, Eltzschig HK, McNamee EN, NK cells regulate CXCR2+ neutrophil recruitment during acute lung injury. <i>J Leukoc Biol</i> 2017, 101:471-480. | 4,165 |
| Hoegl S , Brodsky KS, Blackburn MR, Karmouty-Quintana H, Zwissler B, Eltzschig HK. Alveolar Epithelial A2B Adenosine Receptors in Pulmonary Protection during Acute Lung Injury. <i>J Immunol.</i> 2015 Aug 15; 195(4):1815-24. | 4,985 |
| Hoegl S , Meinel F, Thieme SF, Johnson T, Eickelberg O, Zwissler B, Nikolaou K. Worsening respiratory function in mechanically ventilated intensive care patients: feasibility and value of xenon-enhanced dual energy CT. <i>Eur J Radiol.</i> 2013; 82(3):557-62. | 2,160 |
| Hoegl S , Bachmann M, Scheiermann P, Goren I, Hofstetter C, Pfeilschifter J, Zwissler B, Muhl H. Protective Properties of Inhaled IL-22 in a Model of Ventilator-induced Lung Injury. <i>Am J Respir Cell Mol Biol</i> 2011; 44(3):369-76. | 5,125 |
| Hoegl S , Chappell D, Flondor M, Boost KA, Hofstetter C, Zwissler B, Rehm M. Die prophylaktische Inhalation von Iloprost vermindert pulmonale Schäden und die Zerstörung der Glykokalyx beim beatmungsinduzierten Lungenschaden der Ratte. <i>Anästh Intensivmed</i> 2011, 52[Suppl], S480. | 0,862 |
| Hoegl S , Boost KA, Czerwonka H, Dolfen A, Scheiermann P, Muhl H et al. Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. <i>Respir Med</i> 2009; 103:463-470. | 2,331 |
| Hoegl S , Boost KA, Flondor M, Scheiermann P, Muhl H, Pfeilschifter J et al. Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat. <i>Int J Mol Med</i> 2008; 21:513-519 | 1,880 |

1.2. Originalarbeiten als Koautorin

| | Impact Faktor |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Scheiermann P, Hoegl S , Hofstetter C, Pfeilschifter J, Zwissler B, Muhl H et al. Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats. <i>Int Immunopharmacol</i> 2011; 11:719-723. | 2,376 |
| Scheiermann P, Ott J, Hoegl S , Hecker M, Hofstetter C, Seeger W et al. Effects of short-term infusion of lipid emulsions on pro-inflammatory cytokines and lymphocyte apoptosis in septic and non-septic rats. <i>Br J Nutr</i> 2011; 106(1):27-32. | 3,013 |
| Thieme SF, Hoegl S , Nikolaou K, Fisahn J, Irlbeck M, Maxien D, Reiser MF, Becker CR, Johnson TR. Pulmonary ventilation and perfusion imaging with dual-energy CT. <i>Eur Radiol</i> . 2010;20(12):2882-9. | 3,594 |
| Hofstetter C, Scheller B, Hoegl S , Mack MG, Zwissler B, Byhahn C. Cuff overinflation and endotracheal tube obstruction: case report and experimental study. <i>Scand J Trauma Resusc Emerg Med</i> 2010; 18:18. | 2,176 |
| Scheiermann P, Ahluwalia D, Hoegl S , Dolfen A, Revermann M, Zwissler B et al. Effects of intravenous and inhaled levosimendan in severe rodent sepsis. <i>Intensive Care Med</i> . 2009; 35(8):1412-9. | 5,168 |
| Boost KA, Leipold T, Scheiermann P, Hoegl S , Sadik CD, Hofstetter C et al. Sevoflurane and isoflurane decrease TNF-alpha-induced gene expression in human monocytic THP-1 cells: Potential role of intracellular IkappaBalpha regulation. <i>Int J Mol Med</i> 2009; 23:665-671. | 1,980 |
| Scheiermann P, Hoegl S , Revermann M, Ahluwalia D, Zander J, Boost KA et al. Cecal ligation and incision: an acute onset model of severe sepsis in rats. <i>J Surg Res</i> 2009; 151:132-137. | 2,176 |
| Boost KA, Hoegl S , Dolfen A, Czerwonka H, Scheiermann P, Zwissler B et al. Inhaled levosimendan reduces mortality and release of proinflammatory mediators in a rat model of experimental ventilator-induced lung injury. <i>Crit Care Med</i> 2008; 36:1873-1879. | 6,594 |
| Hofstetter C, Boost KA, Hoegl S , Flondor M, Scheller B, Muhl H et al. Norepinephrine and vasopressin counteract anti-inflammatory effects of isoflurane in endotoxemic rats. <i>Int J Mol Med</i> 2007; 20(4):597-604. | 1,847 |
| Boost KA, Flondor M, Hofstetter C, Platadis I, Stegwerth K, Hoegl S et al. The beta-adrenoceptor antagonist propranolol counteracts anti-inflammatory effects of isoflurane in rat endotoxemia. <i>Acta</i> | 1,719 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Anaesthesiol Scand 2007; 51(7):900-8. | |
| Boost KA, Hoegl S , Hofstetter C, Flondor M, Stegwerth K, Platacis I et al. Targeting caspase-1 by inhalation-therapy: effects of Ac-YVAD-CHO on IL-1 beta, IL-18 and downstream proinflammatory parameters as detected in rat endotoxaemia. <i>Intensive Care Med</i> 2007; 33(5):863-71. | 4,623 |
| Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S , Muhl H, Zwissler B. Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat. <i>Crit Care Med</i> 2005; 33(10):2317-22. | 5,077 |
| Hofstetter C, Flondor M, Thein E, Hoegl S , Kemming G, Kisch-Wedel H et al. Aerosol delivery during mechanical ventilation to the rat. <i>Exp Lung Res</i> 2004; 30:635-651. | 1,464 |

1.3. Übersichtsarbeiten / Reviews

| | Impact Faktor |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Hoegl S , Zwissler B, Eltzschig HK, Vohwinkel C. Acute respiratory distress syndrome following cardiovascular surgery: current concepts and novel therapeutic approaches. <i>Curr Opin Anaesthesiol.</i> 2016 Feb; 29(1):94-100 | 1,916 |
| Vohwinkel CU, Hoegl S , Eltzschig HK. Hypoxia signaling during acute lung injury. <i>J Appl Physiol (1985).</i> 2015 Nov 15; 119(10):1157-63. | 3,004 |

1.4. Buchkapitel / Book Chapters

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chapter: Thoracic Imaging - Lung Ventilation; in " <i>Dual Energy CT in Clinical Practice (Medical Radiology, Diagnostic Imaging)</i> "; Volume editors: T.R.C. Johnson, C. Fink, S.O. Schönberg, and M.F. Reiser; Springer, Berlin 2011 |
| Adjunktive Therapien beim ARDS. Was hilft wirklich? in „ <i>DIVI Jahrbuch 2017/2018</i> “; Hrsg.: S. Kluge, A. Markewitz, S. Schwab et al.; MWV, Berlin 2017 |

1.5. Editorial

| | Impact Faktor |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Hoegl S , Zwissler B. Preventing ventilator-induced lung injury - What does the evidence say? <i>J Thorac Dis.</i> 2017; in press | 2,365 |

9. Publikationen der kumulativen Habilitationsleistung

Hoegl S, Boost KA, Flondor M, Scheiermann P, Muhl H, Pfeilschifter J, Zwissler B, Hofstetter C: Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat. *International journal of molecular medicine* 2008, 21:513-519.

Hoegl S, Boost KA, Czerwonka H, Dolfen A, Scheiermann P, Muhl H, Zwissler B, Hofstetter C: Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respiratory medicine* 2009, 103:463-470.

Hoegl S, Bachmann M, Scheiermann P, Goren I, Hofstetter C, Pfeilschifter J, Zwissler B, Muhl H: Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011, 44:369-376.

Hoegl S, Brodsky KS, Blackburn MR, Karmouty-Quintana H, Zwissler B, Eltzschig HK: Alveolar Epithelial A2B Adenosine Receptors in Pulmonary Protection during Acute Lung Injury. *J Immunol* 2015, 195:1815-1824.

Hoegl S, Ehrentraut H, Brodsky KS, Victorino F, Golden-Mason L, Eltzschig HK, McNamee EN: NK cells regulate CXCR2+ neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Leukoc Biol* 2017, 101:471-480.